

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/88, C07K 16/40, G01N 33/564, C12N 15/07</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/04085</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Februar 1997 (06.02.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/03093</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Juli 1996 (15.07.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 25 784.7 14. Juli 1995 (14.07.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim-Waldhof (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ENDL, Josef [DE/DE]; Ulmenstrasse 12, D-82362 Weilheim (DE). STAHL, Pe- ter [DE/DE]; Hirtenstrasse 12, D-82347 Bernried (DE). ALBERT, Winfried [AT/DE]; Hauptstrasse 16A, D-82390 Eberfing (DE). SCHENDEL, Dolores [US/DE]; Hans-Sachs- Strasse 123, D-80469 München (DE). BOITARD, Christian [FR/FR]; 158 bis, avenue Suffren, F-75015 Paris (FR). VAN ENDERT, Peter [DE/FR]; 30, passage Thiere, F-75011 Paris (FR). JUNG, Günther-Gerhard [DE/DE]; Auf der Morgen- stelle 18, D-72076 Tübingen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D- 81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(54) Title: AUTOREACTIVE PEPTIDES FROM HUMAN GLUTAMIC ACID-DECARBOXYLASE (GAD)</p> <p>(54) Bezeichnung: AUTOREAKTIVE PEPTIDE AUS DER HUMANEN GLUTAMINSÄURE-DECARBOXYLASE (GAD)</p> <p>(57) Abstract</p> <p style="margin-left: 20px;">Autoreactive peptides, peptide-MHC complexes, T-cell sub-populations that react thereto and the diagnostic and therapeutical applications of these compounds are disclosed.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="margin-left: 20px;">Die Erfindung betrifft autoreaktive Peptide, Peptid-MHC-Komplexe, damit reagierende T-Zellsubpopulationen sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen dieser Verbindungen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Autoreaktive Peptide aus der humanen Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD)

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Autoimmunreaktion hervorrufoende Peptide, Komplexe dieser Peptide mit Molekülen des Major Histocompatibility Komplex (MHC), mit den Peptiden oder/und den Komplexen aus Peptiden und MHC-Molekülen reagie-
10 rende T-Zellsubpopulationen sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen dieser Verbindungen.

Die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie etwa der rheumatoiden
15 Arthritis und des juvenilen Diabetes (IDDM), ist innerhalb der letzten Jahre schnell fortgeschritten und läßt mittlerweile konkrete Anwendungen für die frühe Diagnose und eine kausale Therapie dieser Erkrankungen erkennen.

20 Heute gilt als gesichert, daß bei der Entstehung dieser Erkrankungen neben einer genetischen Disposition auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Auf der Ebene der genetischen Risikofaktoren sind z.B. bei dem IDDM nur einige wenige Allele der MHC-Klasse II-Antigene eng mit dieser Erkrankung assoziiert.
25 Somit besteht die Möglichkeit, über eine Analyse dieser Allele eine Risikogruppe für IDDM zu definieren (vgl. z.B. Thomson et al., Am. J. Hum. Genet. 43 (1988), 799-816 oder Todd et al., Nature 329 (1987), 599-604).

30 Bei den an der Entstehung von IDDM beteiligten Umweltfaktoren handelt es sich wahrscheinlich um exogene, als Immunogen wirksame Peptidsequenzen. In diesem Zusammenhang werden u.a. virale Antigene, die partielle Homologien zu körpereigenen Strukturen aufweisen, diskutiert. Unter besonderen Umständen,
35 insbesondere in der postnatalen Phase, können durch die Nahrung aufgenommene Antigene, wie z.B. Rinderserumalbumin, eine Immunantwort induzieren, welche aufgrund von Homologien zu

körpereigenen Strukturen einen autoaggressiven Prozeß in Gang setzen können.

Typisch für den Krankheitsverlauf bei IDDM ist die progressive
5 Zerstörung der Pankreas- β -Zellen durch cytotoxische Lymphozy-
ten. Dieser Prozeß setzt schon lange vor einer erkennbaren
Störung des Glucosestoffwechsels ein. Bei einer erkennbaren
Manifestation des Diabetes sind bereits über 90 % der β -Zellen
zerstört. Es wäre deshalb außerordentlich wichtig, diese auto-
10 aggressiven T-Zellen frühzeitig bei Risikopersonen zu erfas-
sen, um die betroffenen Individuen einer kausalen Therapie
zuföhren zu können.

Es gilt heute als gesichert, daß die Zerstörung von körper-
15 eigenem Gewebe bei Autoimmunerkrankungen anfänglich sehr lang-
sam verläuft. Im Anfangsstadium dieses Prozesses erkennen die
autoaggressiven T-Zellen wahrscheinlich nur ein oder wenige
Autoantigene. Arbeiten von Kaufman et al. (Nature 368 (1993),
69-72) und Tisch et al. (Nature 368 (1993), 72-78) an einem
20 Tiermodell (NOD-Maus) des Typ I-Diabetes haben ergeben, daß
beim spontan auftretenden Diabetes dieses Mausstammes die
initiale, über T-Zellen vermittelte Auto-Immunreaktion gegen
die Glutaminsäure-Decarboxylase gerichtet ist. Dabei werden in
der NOD-Maus anfänglich nur 1 bis 2 Epitope am C-Terminus der
25 Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) erkannt. Zu diesem Zeitpunkt
lassen sich - wie oben ausgeführt - noch keine Veränderungen
im Glucose-Metabolismus feststellen, während hingegen eine
Perinsulitis bereits nachweisbar ist. Erst im weiteren Krank-
heitsverlauf weitet sich das Spektrum der von den autoaggres-
30 siven T-Zellen erkannten Peptide der GAD aus. Nach einer Mani-
festation des Diabetes sind auch präaktivierte T-Zellen gegen
andere Inselzell-Antigene nachweisbar, z.B. Peripherin, Heat
Shock Protein HSP 65 und Carboxypeptidase H.

35 Es gibt Hinweise, daß auch beim Menschen die Immunantwort
gegen GAD ursächlich mit dem Entstehen des Typ I-Diabetes
verknüpft ist. So lassen sich beispielsweise in über 80 % der

- 3 -

Prädiabetiker Autoantikörper gegen GAD nachweisen, wobei die ätiologische Rolle dieser Autoantikörper allerdings gering eingeschätzt wird. Man nimmt vielmehr an, daß beim Typ I-Diabetes eine progressive Zerstörung der Pankreas- β -Zellen durch T-Lymphozyten vorliegt. Diese gegen GAD gerichteten T-Lymphozyten konnten bereits von mehreren Forschergruppen nachgewiesen werden (Harrison et al., J. Clin. Invest. 89 (1992), 1161; Honeyman et al., J. Exp. Med. 177 (1993), 535). Die von diesen Gruppen gefundenen Autoantikörper reagierten mit einem aus den Aminosäuren 208 bis 404 bestehenden Peptidfragment des GAD 67 kd Moleküls.

In EP-A-0 519 469 werden autoimmun reagierende Polypeptide aus dem humanen GAD 65 kd Molekül offenbart. Diese Polypeptide haben die Aminosäuresequenz:

X-P-E-V-K-(T oder E)-K-Z,

wobei X eine fakultative, aus 1 bis 10 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist und Z eine fakultative, aus 1 bis 8 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist.

In der europäischen Patentanmeldung Nr. 95 100 764.0 werden autoreaktive Peptidsequenzen aus der humanen GAD 65 kd vorgeschlagen, umfassend:

(a) die Aminosäuresequenz

G-M-A-A-L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-F-S-L-K-K-G-A-A,

(b) die Aminosäuresequenz

E-R-G-K-M-I-P-S-D-L-E-R-R-I-L-E-A-K-Q-K,

(c) eine der in Abb. 1 oder 2 dargestellten Aminosäuresequenzen,

- 4 -

- (d) Teilbereiche der in (a), (b) oder/und (c) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und
- 5 (e) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c) oder/und (d) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.
- 10 Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, neue autoreaktive Peptide bereitzustellen, die mit T-Zellen aus Typ I-Diabetikern, insbesondere mit T-Zellen aus frisch entdeckten Typ I-Diabetikern reagieren und somit frühe Auto-Epitope definieren.
- 15 Diese Aufgabe wird gelöst durch Peptide, Peptid-Derivate oder analog bindende Moleküle, die zum Nachweis, zur Isolierung, zur Vermehrung, zur Anergisierung oder/und zur Elimination autoreaktiver T-Zellen geeignet sind. Ein Gegenstand der Er-
- 20 findung ist somit ein Peptid oder Peptid-Derivat, umfassend:
- (a) die Aminosäuresequenz (I)
D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-G-E-R,
- 25 (b) die Aminosäuresequenz (II)
S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,
- (c) die Aminosäuresequenz (III)
N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,
- 30 (d) die Aminosäuresequenz (IV)
T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,
- (e) die Aminosäuresequenz (V)
35 P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,

- 5 -

(f) die Aminosäuresequenz (VI)

T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,

(g) die Aminosäuresequenz (VII)

5 F-F-R-M-V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F-L-I,

(h) Teilbereiche der in (a), (b), (c), (d), (e), (f) oder/und
(g) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von
mindestens 6 Aminosäuren oder/und

10

(i) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente
Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle
wie die in (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) oder/und (h)
dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.

15

Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VII) entsprechen den Amino-
saureresten 86-105 (I), 246-265 (II), 146-165 (III), 166-185
(IV), 176-195 (V), 206-225 (VI) und 556-575 der humanen GAD
65.

20

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Peptide, welche
den Aminosäuresequenzen (I) bis (VII) der humanen GAD 65 ent-
sprechen, eine spezifische Reaktion mit T-Zellsubpopulationen
zeigten, die aus frisch entdeckten Typ I-Diabetikern isoliert
25 wurden. Somit handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pepti-
den um frühe Autoepitope, mit deren Verwendung eine sehr frühe
Diagnose des Typ I-Diabetes ermöglicht wird. Weiterhin können
die erfindungsgemäßen Peptide auch therapeutisch angewendet
werden, indem die mit den Peptiden reaktive T-Zellpopulation
30 ausgeschaltet wird.

Bevorzugte Beispiele für T-Zellsubpopulationen, mit denen die
erfindungsgemäßen Peptide der Aminosäuresequenzen (I) oder/und
(II) reagieren, sind die T-Zelllinien R.B. und M.C. oder T-
35 Zellen mit einer äquivalenten Bindungsspezifität.

Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VII) sind Teilbereiche aus der 65 kD Isoform der humanen Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), deren vollständige Aminosäuresequenz von Bu et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 2115 ff.) beschrieben wurde. Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VII) wurden durch Anlegen von T-Zelllinien aus dem peripheren Blut von Typ I-Diabetikern und anschließende in vitro Stimulation mit rekombinanter humaner GAD und Testen dieser T-Zelllinien in einem Proliferationsassay mit synthetischen Peptidsequenzen gefunden, die aus der humanen GAD-Sequenz abgeleitet wurden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können durch bekannte Syntheseverfahren mittels chemischer Methoden erzeugt werden oder durch Klonierung und Expression einer für diese Peptide codierenden DNA-Sequenz in einer geeigneten Wirtszelle, insbesondere E.coli, auf gentechnische Weise hergestellt werden.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch Peptide mit Teilbereichen der spezifisch angegebenen Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) oder (VII), die eine Länge von mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens 8 Aminosäuren, besonders bevorzugt von mindestens 10 Aminosäuren und am meisten bevorzugt von mindestens 15 Aminosäuren aufweisen. Die minimale Länge eines erfindungsgemäßen Peptids wird durch seine Fähigkeit bestimmt, ein MHC-Molekül zu erkennen, mit ihm spezifisch zu binden und mit dem entsprechenden T-Zellrezeptor zu reagieren.

Die maximale Länge der aus der GAD stammenden und MHC-bindenden Abschnitte in einem erfindungsgemäßen Peptid beträgt vorzugsweise 100 Aminosäuren, besonders bevorzugt 50 Aminosäuren und am meisten bevorzugt 25 Aminosäuren.

Neben Peptiden mit den Aminosäuresequenzen (I) bis (VII) oder Teilbereichen davon betrifft die Erfindung auch noch Peptide mit Aminosäuresequenzen, die im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die

zuvor genannten Sequenzen zeigen und die vorzugsweise durch Substitution, Deletion oder Insertion einzelner Aminosäurereste oder kurzer Abschnitte von Aminosäureresten aus den Aminosäuresequenzen (I) bis (VII) abgeleitet sind oder analog s bindende verfremdete Substanzen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung auch Peptidvarianten, die in ihrer Sequenz mit den oben genannten Aminosäuresequenzen nicht völlig übereinstimmen, sondern nur gleiche oder nahe verwandte "Ankerpositionen" aufweisen. Die Bezeichnung "Ankerposition" bedeutet in diesem Zusammenhang einen für die Bindung an ein MHC-Molekül, insbesondere an ein MHC-Molekül der Klassen DR1, DR2, DR3, DR4 oder DQ, wesentlichen Aminosäurerest. Die Ankerposition für das DRB1*0401-Bindungsmotiv sind z.B. bei Hammer et al., Cell 74 (1993), 197-203, angegeben. Derartige Ankerpositionen sind in erfindungsgemäßen Peptiden konserviert oder gegebenenfalls durch Aminosäurereste mit chemisch sehr nahe verwandten Seitenketten ersetzt (z.B. Alanin durch Valin, Leucin durch Isoleucin und umgekehrt). Die Bestimmung der Ankerpositionen in den erfindungsgemäßen Peptiden kann auf einfache Weise durch Tests von Varianten der oben angegebenen spezifischen Peptide auf ihre Bindungsfähigkeit an MHC-Moleküle erfolgen. Erfindungsgemäße Peptide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide zeigen. Vorzugsweise besitzen die aus Peptiden mit den Aminosäuresequenzen (I) bis (VII) abgeleiteten Peptide eine Sequenzhomologie von mindestens 30 %, besonders bevorzugt von mindestens 50 % und am meisten bevorzugt mindestens 60 % mit den Ausgangspeptiden oder Teilsequenzen davon.

Beispiele für Varianten der spezifisch angegebenen Peptide sind die entsprechenden homologen Peptidabschnitte aus der humanen GAD 67, deren vollständige Aminosäuresequenz ebenfalls von Bu et al., Supra, beschrieben wurde.

Der Begriff "im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle" umfaßt auch eine gegenüber den Aminosäuresequenzen (I) bis (VII) verbesserte Bindungsspezifität oder/und -affinität, die insbesondere bei verkürzten Peptiden gefunden wird, die eine Länge von vorzugsweise 8 bis 15 Aminosäuren besitzen.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch Peptid-Derivate. Dieser Begriff umfaßt Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch eine chemische Reaktion derivatisiert worden sind. Beispiele von erfindungsgemäßen Peptid-Derivaten sind insbesondere solche Moleküle, in denen das Backbone oder/und reaktive Aminosäureseitengruppen, z.B. freie Aminogruppen, freie Carboxylgruppen oder/und freie Hydroxylgruppen, derivatisiert worden sind. Spezifische Beispiele für Derivate von Aminogruppen sind Sulfonsäure- oder Carbonsäureamide, Thiourethanderivate und Ammoniumsalze, z.B. Hydrochloride. Beispiele für Carboxylgruppenderivate sind Salze, Ester und Amide. Beispiele für Hydroxylgruppenderivate sind O-Acyl- oder O-Alkyllderivate. Weiterhin umfaßt der Begriff Peptid-Derivat gemäß vorliegender Erfindung auch solche Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch natürlich vorkommende oder nicht natürlich vorkommende Aminosäurehomologe der 20 "Standard"-Aminosäuren ersetzt werden. Beispiele für solche Homologe sind 4-Hydroxyprolin, 5-Hydroxylysin, 3-Methylhistidin, Homoserin, Ornithin, β -Alanin und 4-Aminobuttersäure.

Insbesondere sind solche Peptide bevorzugt, welche eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie Peptide mit den Aminosäuresequenzen (I) bis (VII) aufweisen, die aber im Gegensatz zu diesen Peptiden keine Aktivierung von T-Zellen, sondern die Erzeugung eines anergen Zustands in T-Zellen hervorrufen.

Von der vorliegenden Erfindung werden auch Polypeptide erfaßt, in denen der MHC-bindende Peptidabschnitt Bestandteil einer größeren Polypeptideinheit ist, wobei die Verbindung von MHC-

bindendem Peptid und dem Rest der Polypeptideinheit vorzugsweise eine Sollbruchstelle aufweist, z.B. eine Proteasespaltstelle.

5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Peptid oder Peptid-Derivat, das eine signalerzeugende Substanz bzw. eine Markierungsgruppe, z.B. eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe (z.B. Rhodamin, Phycoerythrin), Digoxin, Biotin, eine
10 radioaktive Gruppe oder eine Toxingruppe (z.B. Ricin, Cholera-toxin etc.) trägt. Durch Kopplung des erfindungsgemäßen Peptids mit Markierungsgruppen kann das Peptid als diagnostisches Mittel für in vivo oder in vitro (z.B. Imaging) Anwendungen oder als therapeutisches Mittel eingesetzt werden. Weiterhin kann das erfindungsgemäße Peptid auch beispielsweise in cycli-
15 sierter Form oder in oligomerer Form vorliegen, wobei die für die Bindung an das MHC-Molekül wichtigen Sequenzen durch Spacerregionen voneinander getrennt sind.

Die Erfindung betrifft auch peptidmimetische Substanzen, die
20 eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide oder Peptid-Derivate zeigen. Peptidmimetische Substanzen oder Peptidmimetika sind Verbindungen, die Peptide in ihrer Wechselwirkung mit den MHC-Molekülen ersetzen können und gegenüber
25 den nativen Peptiden eine erhöhte metabolische Stabilität, bessere Bioverfügbarkeit und größere Wirkungsdauer aufweisen können. Methoden zur Herstellung von Peptidmimetika sind beschrieben bei Giannis und Kolter, Angew. Chem. 105 (1993), 1303-1326, Lee et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 66 (1993), 2006-
30 2010 und Dorsch et al., Kontakte (Darmstadt) (1993) (2), 48-56. Bezüglich der Herstellung erfindungsgemäßer peptidmimetischer Substanzen wird auf die Offenbarung dieser Literaturstellen verwiesen.

35 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Komplex, der mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum und mindestens ein MHC-Molekül

- 10 -

oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls umfaßt. In diesem Komplex ist ein Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum mit einer Bindungskonstante von vorzugsweise mindestens 10^{-7} l/mol, besonders bevorzugt im Bereich von 10^{-8} - 10^{-9} l/mol, an ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls gebunden. Alternativ kann das Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum auch kovalent an das MHC-Molekül gekoppelt sein, z.B. über einen Photolinker oder als kovalente genetische Peptid-MHC-Fusion. Ein derartiges Peptid-MHC-Fusionsprotein enthält vorzugsweise eine HLA-DR beta-Kette und ein damit genetisch fusioniertes autoreaktives Peptid. Besonders bevorzugt enthält der Komplex ein MHC-Klasse II-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon.

- 15 Das MHC-Klasse II-Molekül ist vorzugsweise vom Typ DR, beispielsweise vom Typ DR1, DR2, DR4 oder DQ6. Besonders bevorzugt ist das MHC-Klasse II-Molekül vom Typ DR1 (Subtyp DR B1*0101), DR2 (Subtyp B1*1501, DR B1*1502, DR B1*1601 oder DR B5*0101), DR4 (Subtyp DR B1*0401) oder DQ6 (Subtyp DQ B1*0602).
- 20 Die T-Zelllinie R.B. proliferiert mit dem autoreaktiven Peptid der Aminosäuresequenz 86 - 105 von GAD 65 kd in Anwesenheit des DR B1-Allels 0101. Die T-Zelllinie M.C. proliferiert mit dem autoreaktiven Peptid der Aminosäuresequenz 246 - 265 von rGAD in Gegenwart des DR B1-Allels 1501 oder/und des DQ B1-Allels 0602. Für das autoreaktive Peptid mit der Aminosäuresequenz 556-575 von GAD wurde das DR B1-Allel 0401 als Restriktionselement identifiziert.

Die Nukleotidsequenzen der für ein MHC-Klasse II-Molekül der obigen Subtypen kodierenden Gene sind veröffentlicht in Corell et al. (Mol. Immunol. 28 (1991), 533-543). Auf den Inhalt dieser Publikation wird hiermit Bezug genommen.

Der Begriff "peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls" umfaßt Fragmente von MHC-Molekülen, die durch proteolytische Spaltung nativer MHC-Moleküle oder durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt sind und ihre peptidbindenden Eigen-

schaften im wesentlichen beibehalten haben. Weiterhin sind unter diesem Begriff Fusionsproteine zu verstehen, die neben einem für die Peptidbindung verantwortlichen MHC-Anteil noch weitere Polypeptid-Komponenten enthalten.

5 Die erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplexe werden vorzugsweise durch Assoziierung peptidfreier MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-derivate mit den erfindungsgemäßen Peptiden, Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika hergestellt. Die Herstellung von peptid-
10 freien MHC-Molekülen kann beispielsweise durch Entfaltung von nativen MHC-Molekülen, um gebundene Peptide zu dissoziieren, und Rückfaltung der leeren MHC-Moleküle erfolgen (siehe Dornmair und McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 4134-4138 und WO91/14701).

15 Andererseits können peptidfreie MHC-Moleküle auch durch rekombinante Herstellung von MHC-Molekülen oder Derivaten davon gewonnen werden. Beispiele hierfür sind die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen in Fibroblasten (Germain und Malissen,
20 Ann. Rev. Immunol. 4 (1990), 281-315) sowie die Expression von löslichen MHC-Klasse II-Molekülderivaten ohne Membrananker in CHO-Zellen (Wettstein et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 219-228, Buelow et al., Eur. J. Immunol. 23 (1990), 69-76) und mittels des Baculovirus-Expressionssystems in Insektenzellen
25 (Stern und Wiley, Cell 68 (1992), 465-477; Scheirle et al., J. Immunol. 149 (1992), 1994-1999). Auch MHC-Klasse I-Moleküle wurden in CHO-Zellen (Fahnestock et al., Science 258 (1992), 1658-1662) in Insektenzellen (Jackson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 12117-12120; Matsamura et al., J.
30 Biol. Chem. 267 (1992), 23589-23595) sowie in Fibroblasten (Mage et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 10658-10661) exprimiert.

Weiterhin ist auch die Expression von peptidfreien MHC-Molekü-
35 len in E.coli bekannt (Parker et al., Mol. Immunol. 29 (1992), 371-378; Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 8403-8407; Garboczi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89

(1992), 3429-3433; Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 10330-10334). Auf die in diesen Veröffentlichungen beschriebenen Techniken zur rekombinanten Expression von MHC-Molekülen oder MHC-Molekülderivaten wird für die vorliegende
5 Erfindung Bezug genommen.

Vorzugsweise ist der MHC-Bestandteil des erfindungsgemäßen Komplexes ein rekombinantes MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon und besonders bevorzugt ein lösliches MHC-
10 Molekülderivat, bei dem der Membrananker teilweise oder vollständig deletiert ist.

Zur Identifizierung von MHC-Molekülen, welche das erfindungsgemäße autoreaktive Peptid präsentieren, werden die Antigen
15 präsentierenden Zellen eines Spenders mit dem erfindungsgemäßen Peptid in markierter Form inkubiert, wobei vorzugsweise zuerst gebundene Peptide durch Denaturierung nativer MHC-Moleküle dissoziiert werden. Anschließend können die markierten MHC-Peptid-Komplexe mit Subtyp-spezifischen Antikörpern, die
20 gegen Framework-spezifische Determinanten der MHC-Moleküle gerichtet sind, immunpräzipitiert und aufgrund des Vorhandenseins der markierten Peptide identifiziert werden.

Alternativ können als Antigen präsentierende Zellen auch EBV
25 (Epstein-Barr-Virus) transformierte B-Zellen des Spenders verwendet werden.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Komplexe aus einem rekombinanten MHC-Molekülderivat kann beispielsweise so erfolgen, daß DNA-Fragmente für die löslichen Teile der α - und β -
30 Ketten eines MHC-Moleküls, z.B. eines MHC-DR1-, DR2- oder DQ1-Moleküls durch PCR isoliert werden, wobei als Template cDNA aus einer EBV transformierten B-Zelllinie des Spenders benutzt wird, welche das entsprechende MHC-Molekül exprimiert. Bei
35 diesem Schritt wird vorzugsweise am C-Terminus der α - und der β -Kette durch entsprechende Auswahl des PCR-Primers eine Reinigungshilfe, z.B. ein Oligohistidinsegment (z.B. ein Hexa-

Histidin-Segment), eingeführt. Die PCR-Produkte können anschließend in E.coli subkloniert und als Inclusion-Bodies exprimiert werden. Die Inclusion-Bodies können nach bekannten Verfahren (vgl. Literaturstellen zur Expression von MHC-Molekülen in E.coli, supra) solubilisiert und die MHC-Proteine mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Anschließend werden die α - und β -Untereinheiten in Anwesenheit des Peptids renaturiert.

10 Der erfindungsgemäße Peptid-MHC-Komplex kann auch eine wie oben beschriebene Markierungsgruppe tragen, wobei die Markierungsgruppe sowohl am Peptidbestandteil als auch am MHC-Bestandteil des Komplexes durch bekannte Methoden gebunden sein kann.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein oligomerisierter Peptid-MHC-Komplex, der mindestens 2 MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-derivate enthält, die über kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen assoziiert sind. Ein
20 derartiger oligomerisierter Peptid-MHC-Molekül-Komplex hat gegenüber bekannten (bezüglich des MHC-Moleküls) monomeren Komplexen den Vorteil einer höheren Affinität und somit einer verbesserten diagnostischen oder/und therapeutischen Wirksamkeit.

25 In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann ein derartiger oligomerisierter Komplex durch kovalente Quervernetzung von monomeren Peptid/MHC-Molekül-Komplexen über chemische Kopplungsreagenzien, z.B. N-Succinimidyl-3(2-pyridylthio)propionat, 3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester, Maleimidohexanoyl-N-hydroxy-succinimidester, Bis(maleimidomethyl)ether, Disuccinimidylsuberat, Glutardialdehyd etc. nach
30 bekannten Verfahren hergestellt werden. Gegebenenfalls können auch einzelne Aminosäuren der Peptidkomponente oder der MHC-Komponente so verändert sein, daß spezielle Kopplungsreagenzien an dieser Stelle bevorzugt angreifen. So lassen sich
35 durch Einführung von zusätzlichen Cystein- oder Lysin-Resten

auf rekombinantem Wege bei der Proteinkomponente bzw. durch chemische Synthese bei der Peptidkomponente Kopplungen über SH-Linker bzw. über Aminogruppen erzielen.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann der oligomerisierte Peptid-MHC-Komplex so hergestellt werden, daß die an das MHC-Molekül bindende Peptidkomponente als Oligomer eingesetzt wird, d.h. als ein Peptidmolekül, das mindestens 2 MHC-bindende Bereiche enthält, wobei die für die
- 10 Bindung an das MHC-Molekül wichtigen Sequenzen durch Spacerregionen voneinander getrennt sind. Diese Spacerregionen bestehen üblicherweise aus 10-15 Aminosäuren. Man verwendet kleine, hydrophile Aminosäuren, z.B. Glycin, Alanin, Serin, Prolin bzw. Kombinationen davon. Bei einer Renaturierung von peptid-
- 15 freien MHC-Molekülen in Anwesenheit dieser Peptidoligomere entsteht der erfindungsgemäße oligomerisierte Komplex, der durch die oligomerisierte Peptidkomponente über nicht-kovalente Wechselwirkungen vernetzte MHC-Moleküle enthält.
- 20 Weiterhin können oligomerisierte Peptid-MHC-Komplexe durch Modifikation rekombinant hergestellter MHC-Moleküle erzeugt werden. So kann bei Herstellung der Vektoren für die Expression rekombinanter α - bzw. β -Ketten von MHC-Klasse II-Molekülen ein Gensegment, vorzugsweise jeweils am C-Terminus, ein-
- 25 kloniert werden, das für ein Epitop codiert, das von einem Antikörper erkannt wird. Dieser Antikörper kann vom IgG-Typ, vorzugsweise aber vom IgM-Typ sein. Die renaturierten monomeren Peptid/MHC-Komplexe werden dann mit einem, das eingeführte Epitop erkennenden Antikörper inkubiert, so daß nicht-kovalent
- 30 vernetzte Immunkomplexe, bestehend aus mehreren Antikörpern und mehreren Peptid-MHC-Komplexen, erzeugt werden. Die Einführung von DNA-Segmenten, die für ein Epitop codieren, in die für die α - bzw. β -Kette des MHC-Moleküls codierenden DNA-Fragmente kann mittels bekannter molekularbiologischer Techniken
- 35 erfolgen, z.B. durch Insertion in Restriktionsstellen oder durch zielgerichtete Mutagenese.

Der erfindungsgemäße oligomerisierte Peptid-MHC-Komplex enthält ein Peptid, das die Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), Teilbereiche davon oder/und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen umfaßt, oder ein Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum davon. Der oligomerisierte Komplex kann vorzugsweise als diagnostisches oder therapeutisches Reagenz bei Typ I-Diabetes eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft somit auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex als aktive Komponente gegebenenfalls in Kombination mit pharmazeutisch üblichen Zusatzstoffen enthält. Die Zusammensetzung kann weiterhin eine akzessorische stimulierende Komponente enthalten, z.B. Cytokine wie IL-2 und IL-4 oder/und das Oberflächenantigen B7 (Wyss-Coray et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 2175-2180; Freeman et al., Science 262 (1993), 909-911), das mit dem Oberflächenmolekül CD-28 auf einer T-Zelle binden kann. Die Anwesenheit der akzessorischen stimulierenden Komponente kann die therapeutische Wirkung der Zusammensetzung verbessern oder/und modifizieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex enthält zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Erkrankungen oder einer Prädisposition für Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen, oder für die Diagnose von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen, insbesondere für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen, z.B. Diabetes Typ I oder Typ II, vorzugsweise Diabetes Typ I.

Analoge diagnostische Anwendungen sind jedoch auch bei anderen Autoimmunerkrankungen möglich. Beispiele derartiger Autoimmunerkrankungen sind Multiple Sklerose, wo reaktive T-Zellen

gegen das Myelin Basic Protein oder das Proteolipid-Protein bestimmt werden können, rheumatoide Arthritis, wo reaktive T-Zellen gegen Kollagen Typ II, Cytokeratine und Hsp 65 bestimmt werden können, Basedow-Krankheit, wo reaktive T-Zellen gegen
5 Thyroidperoxidase bestimmt werden können.

Allgemein ist die diagnostische Anwendung bei allen Erkrankungen möglich, die das Immunsystem beeinflussen, wie z.B. auch bei der Arteriosklerose. Hier wurde eine Assoziation der
10 Krankheit mit einer Immunantwort gegen das Heat Shock Protein Hsp 65 nachgewiesen (Xu et al., Lancet 341, 8840 (1993), 255-259).

Noch eine weitere Anwendung ist der diagnostische Nachweis von
15 T-Zellen, die gegen Tumorantigene reagieren. Beispiele hierfür sind T-Zellen gegen ein Melanom-assoziiertes Antigen MAGE 1, die aus Melanompatienten isoliert wurden (van der Bruggen et al., Science 254 (1991), 1643-1647). Der Nachweis dieser T-Zellen kann mit erfindungsgemäßen oligomerisierten Komplexen
20 schon in einem Stadium erfolgen, in dem der Tumor aufgrund einer noch zu geringen Zellmasse mit herkömmlichen Methoden noch nicht nachweisbar ist. Ferner könnte der Nachweis von spezifisch reagierenden T-Zellen auch zur Verlaufskontrolle bei einer Anti-Tumorvakzinierung eingesetzt werden.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe, die vorzugsweise aus einer Körperflüssigkeit, z.B. Vollblut, stammt, mit einem erfindungsgemäßen Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einem erfindungsgemäßen Komplex in Kontakt bringt und die Reaktion von T-Zellen mit dem Peptid oder Komplex bestimmt. Eine spezifische Reaktion von T-Zellen mit dem Komplex oder dem Peptid
30 kann z.B. durch eine erhöhte T-Zellenproliferation nachgewiesen werden, die sich durch den Einbau von Radioaktivität messen läßt. Andererseits kann die Reaktion von T-Zellen auch

direkt durch Verwendung eines markierten Peptids oder Komplexes bestimmt werden. Bei dieser Ausführungsform werden das Peptid oder der Komplex vorzugsweise mit einer daran gekoppelten Fluoreszenzmarkierungsgruppe verwendet. Die Auswertung
5 kann beispielsweise durch FACS-Analyse erfolgen, wobei die T-Zellen mit einem ersten Fluoreszenzmarker, der an einen T-Zell-spezifischen Antikörper gekoppelt ist, und dann mit dem Peptid-MHC-Komplex, der mit einem zweiten Fluoreszenzmarker gekoppelt ist, in Kontakt gebracht werden und das Vorhanden-
10 sein von doppelmarkierten Zellen durch fluorographische Analyse bestimmt wird. Auf diese Weise wird eine T-Zell-Subpopulation bestimmt, die durch ihre Reaktivität mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder Peptid-Derivat oder/und mit einem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex charakterisiert ist.
15 Aufgrund der geringen Konzentration der spezifischen T-Zell-Population im Blut erfolgt als erster Schritt des Verfahrens vorzugsweise eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, z.B. eine selektive Anreicherung von IL-2-Rezeptor-positiven T-Zellen durch Inkubation mit IL-2 oder/und durch Inkubation mit
20 IL-2-Rezeptor-Antikörper und anschließende Separation der Antikörper-bindenden Zellen beispielsweise mit immunmagnetischen Methoden. Andererseits kann die Selektion auf präaktivierte Zellen erst nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex erfolgen.

25

In einer Abwandlung dieses Verfahrens kann auch das Verhältnis von präaktivierten autoreaktiven T-Zellen, d.h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor als Oberflächenmarker, zu nicht-aktivierten autoreaktiven T-Zellen, d.h. T-Zellen ohne den IL-2-Rezeptor,
30 bestimmt werden.

Dieses Verfahren kann insbesondere zur Diagnose von Typ I-Diabetes, aber auch bei anderen das Immunsystem beeinflussen den Erkrankungen bzw. zur Diagnose einer Prädisposition für
35 derartige Erkrankungen angewendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex enthält, zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen. Zur therapeutischen Anwendung der erfindungsgemäßen Peptide und der erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplexe können beispielsweise mit Toxinen gekoppelte Peptide oder Peptid-MHC-Komplexe verwendet werden, andererseits können aber auch Peptide alleine oder als Bestandteile des Komplexes eingesetzt werden, die zwar eine Bindung an den T-Zellrezeptor ermöglichen, aber keine Aktivierung der T-Zelle hervorrufen, d.h. die also anergisierend wirken.

Die therapeutische Wirkung derartiger anergisierender Peptidanaloga beruht darauf, daß der T-Zellrezeptor (TCR) zur Aktivierung der T-Zelle mit einem Peptid wechselwirken muß, das von einem MHC-Antigen der Klasse I oder Klasse II präsentiert wird. Dabei sind insbesondere Aminosäuren in Ankerpositionen des Peptids für die Bindung an das MHC-Molekül verantwortlich, während andere Aminosäuren im Peptid zur Wechselwirkung mit dem TCR beitragen und somit eine T-Zellstimulation hervorrufen. Durch Aminosäuresubstitutionen in den Peptiden können nun Peptidanaloga hergestellt werden, die aufgrund des Vorhandenseins der Ankerpositionen noch an das MHC-Molekül binden, andererseits aber nur eine partielle oder keine T-Zellaktivierung hervorrufen (vgl. z.B. Sloan-Lancaster et al., Nature 363 (1993), 156-159). Z.B. können solche Peptidanaloga bewirken, daß die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle hochreguliert wird (z.B. IL2-Rezeptor, LFA-1), daß jedoch keine Proliferation oder Cytokin-Expression erfolgt. T-Zellen, die mit einem solchen Peptidanalogon in Wechselwirkung treten, gehen in einen sogenannten anergen Zustand über, d.h. sie können auch durch eine nachfolgende reguläre Stimulation mit einem immunogenen Peptid nicht mehr proliferieren. Dieser anerge Zustand hält mindestens 7 Tage an und läßt sich deshalb therapeutisch bei der Behandlung einer Autoimmunerkrankung nutzen.

Ein weiterer therapeutischer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß das Peptid bzw. der Komplex aus Peptid und MHC-Molekül als Antigen verwendet werden kann. Ein derartiges Antigen kann dabei als Immunogen, d.h. als ein die Immunantwort stimulierendes Mittel oder als Tolerogen wirken, d.h. als ein Mittel, das eine Immuntoleranz hervorruft. Die Verwendung als Immunogen kann z.B. bei der Vakzinierung gegen Tumorantigene Verwendung finden. Statt den bisher zu diesem Zweck verwendeten ganzen Tumorzellen ist es möglich, daß von den T-Zellen erkannte tumorspezifische Peptide im Komplex mit dem entsprechenden MHC-Molekül, insbesondere in Form eines oligomerisierten Komplexes, zu injizieren, um eine T-Zellantwort gegen den Tumor zu erzeugen. Zur Erhöhung der Immunstimulation kann dieser Komplex auch in Kombination mit zusätzlichen stimulierenden Substanzen verabreicht werden. Zu diesem Zweck sind beispielsweise Cytokine, wie etwa IL2 oder IL4 geeignet, die gegebenenfalls und vorzugsweise kovalent mit dem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex verknüpft sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Assoziierung des Komplexes mit akzessorischen Komponenten für die T-Zellaktivierung, insbesondere mit für Antigen präsentierenden Zellen essentiellen Oberflächenmolekülen, z.B. dem Oberflächenmolekül B7.

Eine bevorzugte therapeutische Formulierung ist der Einbau von mit Peptid beladenen MHC-Molekülen in künstliche Vesikel, z.B. Lipidvesikel, die gegebenenfalls noch weitere Membrangebundene Moleküle tragen können, wie z.B. B7 oder/und immobilisierte Cytokine.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Isolierung von T-Zellsubpopulationen, die mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder Peptid-MHC-Komplex reagieren. Bei einem solchen Verfahren bringt man eine T-Zellen enthaltende Probe, die z.B. aus einer Körperflüssigkeit stammt, die einem Patienten vorher entnommen wurde, mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder einem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex in Kontakt, identifiziert die mit dem Peptid oder Komplex reagie-

renden T-Zellen und trennt sie gegebenenfalls von anderen T-Zellen ab. Auch hier kann vor oder/und nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex vorzugsweise eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, d.h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor, erfolgen.

Bei einem solchen Verfahren kann man das Peptid oder den Peptid-MHC-Komplex in immobilisierter Form auf einem Träger verwenden, wodurch die Abtrennung der positiv reagierenden T-Zell-Population von anderen T-Zellen vereinfacht wird. Aus den auf diese Weise isolierten T-Zell-Subpopulationen können durch Restimulation T-Zelllinien angelegt werden. Diese autoreaktive T-Zelllinien können dann zur Immunisierung von Patienten verwendet werden.

15

Eine spezifische Immuntherapie des Typ I-Diabetes umfaßt zunächst die Isolierung von spezifischen T-Zelllinien gegen ein Autoantigen, z.B. GAD 65 aus IDDM-Patienten. Dann erfolgt eine Bestimmung der Feinspezifität der T-Zelllinien, d.h. die Identifizierung der autoreaktiven Peptide. Für die spätere Inokulation der Patienten werden solche T-Zelllinien ausgewählt, die ein prädominantes Peptid erkennen, d.h. ein Peptid, gegen das mehrere der isolierten T-Zelllinien reagieren. Insbesondere handelt es sich dabei um T-Zelllinien, welche ein Peptid mit den Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) oder (VII) erkennen.

Falls sich bei einem Patienten kein eindeutig prädominantes Peptid findet, müssen für die spätere Inokulation mehrere T-Zelllinien gemischt werden. Die ausgewählten T-Zellklone werden vor der Inokulation nochmals mit Antigen-präsentierenden Zellen und den entsprechenden Peptiden stimuliert, um eine gute Expression von Aktivierungsmolekülen und insbesondere der T-Zellrezeptoren zu gewährleisten. Dann werden die T-Zelllinien inaktiviert, z.B. durch Hitzebehandlung oder/und radioaktive Bestrahlung, vorzugsweise mit einer Dosis im Bereich von 4000 -10000 rad, besonders bevorzugt ca. 8000 rad, und subkutan in

einer Zellenzahl von vorzugsweise 10^7 bis 5×10^7 in den Patienten, aus dem sie gewonnen wurden, injiziert. Üblicherweise werden mindestens drei Injektionen über einen Zeitraum von 6 bis 12 Monaten verteilt.

5

Anschließend kann man die T-Zellantwort des Patienten auf das Inokulat testen. Hierzu isoliert man die peripheren Blutlymphozyten (PBLs) des Patienten, z.B. über Ficoll-Dichte-Gradientenzentrifugation, und testet die Proliferation gegen das Inokulat in einem Standard-Proliferationstest. Nach erfolgreich verlaufender Immunisierung sollte eine deutliche Proliferation der Patienten-PBLs gegen das Inokulat nachweisbar sein. Eine weitere Kontrolle des Immunisierungserfolgs kann durch Bestimmung der Frequenzen der GAD-reaktiven T-Zellen des Patienten im Verlauf der Immunisierung erfolgen. Dies kann z.B. nach dem Standardverfahren der Limiting Dilution mit autologen Stimulatorzellen erfolgen, die nach Inkubation mit GAD mit z.B. 4000 rad bestrahlt worden sein. Bei erfolgreich verlaufender Immunisierung nimmt die Frequenz der autoreaktiven T-Zellen deutlich ab.

Nach weiterer Eingrenzung der von den regulatorischen T-Zellen erkannten Oberflächenstrukturen auf den T-Zellen des Inokulates kann auch mit Teilstrukturen der regulatorischen T-Zellen immunisiert werden, z.B. mit Segmenten des T-Zellrezeptors.

Andererseits können bei einer Antitumorstimulation auch teilungsfähige T-Zellen reinjiziert werden, die zu einer aktiven Immunisierung des Patienten gegen Tumorzellen führen können.

30

Bei den diagnostischen und therapeutischen Verfahren zur Identifizierung bzw. Aktivierung/Inhibierung von spezifischen T-Zellsubpopulationen kann anstelle der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptid-MHC-Moleküle auch ein anti-idiotypischer Antikörper verwendet werden, der die Wirkung des MHC-Peptid-Komplexes nachahmt. Derartige Antikörper können ohne weiteres erhalten werden, indem eine gegen ein bestimmtes Peptid spezi-

fische T-Zellsubpopulation als Immunogen zur Erzeugung eines Antikörpers (z.B. in einer Maus) verwendet wird oder indem zuerst ein erster Antikörper gegen den MHC-Peptid-Komplex und dann ein anti-idiotypischer Antikörper gegen den ersten Antikörper erzeugt wird.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch ein Antikörper (erster Antikörper) gegen ein erfindungsgemäßes Peptid oder Peptid-Derivat oder einen erfindungsgemäßen Komplex, erhältlich durch Immunisierung, mit dem Peptid, Peptid-Derivat oder Komplex und Gewinnung eines durch Immunisierung erzeugten Antikörpers, vorzugsweise eines durch das Verfahren von Köhler und Milstein oder Weiterentwicklungen davon hergestellten monoklonalen Antikörpers.

Schließlich betrifft die Erfindung auch einen anti-idiotypischen Antikörper gegen den ersten Antikörper, erhältlich durch Immunisierung mit dem ersten Antikörper, der gegen das Peptid oder Peptid-Derivat oder den Komplex gerichtet ist, und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten anti-idiotypischen Antikörpers.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine T-Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen autoreaktiven Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum oder einem Komplex aus Peptid und MHC-Molekül reagiert. Bevorzugte Beispiele sind T-Zellen, die von den T-Zelllinien R.B., M.C., 24/31 oder 40/2, stammen oder eine äquivalente T-Zellrezeptor-Bindungsspezifität aufweisen, d.h. ein von einem MHC-Molekül präsentierte Peptid oder Peptid-Derivat der Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) oder/und (VII) oder/und Teilbereichen dieser Aminosäuresequenzen erkennen. Die T-Zelllinie <GAD> 40/2 wurde am 10.07.1996 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D 38124 Braunschweig, gemäß den Vorschriften des Budapester Vertrags hinterlegt. Eine Eingangsbescheinigung der Hinterlegungsstelle ist den Anmeldungsunterlagen als Anlage beigelegt.

Beispiele für bevorzugte T-Zellen weisen einen T-Zellrezeptor auf, der eine TCR- α -Kette mit einer der in Abb. 5 dargestellten CDR3-Regionen oder/und eine TCR- β -Kette mit einer der in Abb. 6 dargestellten CDR3-Regionen umfaßt. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind T-Zellrezeptoren, die eine zu den in Abbildung 5 oder 6 dargestellten CDR3-Regionen mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 80 % und besonders bevorzugt mindestens 90 % homologe Aminosäuresequenzen aufweisen.

10 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid mit T-Zellrezeptoraktivität, welches an ein erfindungsgemäßes Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder einen ein solches enthaltenden MHC-Komplex bindet. Vorzugsweise umfaßt ein erfindungsgemäßes Polypeptid eine TCR- α -Kette
15 mit einer der in Abb. 5 dargestellten CDR3-Regionen oder einer dazu mindestens 70 % homologen Aminosäuresequenz oder/und eine TCR- β -Kette mit einer der in Abb. 6 dargestellten CDR3-Regionen oder einer dazu mindestens 70 % homologen Aminosäuresequenz.

20

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung von Peptiden aus GAD, insbesondere humaner GAD 65, davon abgeleiteten Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika zur Herstellung eines Arzneimittels, das bei Verabreichung an
25 Diabetes-Patienten zur Ausbildung einer Immuntoleranz führt. Vorzugsweise werden hierfür Peptide der Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII) bzw. mit den in EP 95 100 764.0 vorgeschlagenen Aminosäuresequenzen, Teilbereiche dieser Peptide mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren
30 oder/und Aminosäuren mit einer im wesentlichen äquivalenten Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die obengenannten Peptidsequenzen verwendet. Vorzugsweise haben die Peptide eine Länge von mindestens 8 Aminosäuren, besonders bevorzugt eine Länge von 10 bis 25 Aminosäuren.

35

Grundlage dieser Erfindung sind Beobachtungen, die bei einer in vitro-Verwendung von Peptiden zur T-Zellstimulation gemacht

- wurden. Wenn man nämlich bereits etablierte T-Zelllinien mit einem als reaktiv identifizierten Peptid, z.B. einem Peptid mit einer Länge von 20 Aminosäuren, stimuliert, dann erfolgt eine Proliferation, die annähernd so hoch ist wie bei Verwendung des nativen Antigens, z.B. rekombinante humane GAD 65 kd. Wenn man die solchermaßen expandierten T-Zellen in einer zweiten Runde nach ca. 10 Tagen nochmals restimuliert, erhält man eine viel schwächere proliferative Antwort als wenn in der ersten Runde das native Antigen verwendet wurde. Dieser Befund ist unabhängig davon, ob man bei der zweiten Runde wieder das Peptid oder das native Antigen verwendet. Eine dritte Restimulation endet meistens in einem vollständigen Absterben der T-Zellen, auch wenn als Antigen native GAD 65 kd verwendet wird.
- 15 Für diese Anwendungsform werden die Peptide in relativ hohen Dosierungen, vorzugsweise von 1 bis 100 mg, besonders bevorzugt von 3 bis 30 mg und am meisten bevorzugt von 5 bis 10 mg pro kg Körpergewicht verabreicht.
- 20 Weiterhin ist bevorzugt, daß nach der erstmaligen Verabreichung der Peptide, d.h. der Erstvakzinierung, mindestens noch eine zweite Vakzinierung und besonders bevorzugt noch mindestens eine dritte Vakzinierung durchgeführt wird. Bei der zweiten und den gegebenenfalls folgenden Vakzinierungen werden
- 25 vorzugsweise die bereits zur Erstvakzinierung verwendeten Peptide, komplette GAD oder/und ein die Sequenz der Peptide enthaltender Teil davon eingesetzt. Bei einer Mehrfachvakzinierung sind die Intervalle zwischen den einzelnen Vakzinierungen vorzugsweise jeweils von 5 bis 25 Tagen, besonders
- 30 bevorzugt von 7 bis 14 Tagen.

Weiter soll die Erfindung durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den Abbildungen 1, 2, 3A, 3B, 3C 4A, 4B, 5 und 6 und den Sequenzprotokollen SEQ ID No. 1 bis 30 erläutert werden.

35

- Abb. 1 zeigt autoreaktive Aminosäuresequenzen gemäß EP 95 100 764.0,
- Abb. 2 zeigt weitere autoreaktive Aminosäuresequenzen gemäß EP 95 100 764.0,
- Abb. 3A zeigt das Ergebnis eines Peptid-Screeningassays der T-Zelllinien R.B. und M.C. mit rekombinanter humaner GAD bzw. Peptidpools,
- Abb. 3B zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays mit der T-Zelllinie R.B. mit Einzelpeptiden aus rGAD,
- Abb. 3C zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays mit der T-Zelllinie M.C. mit Einzelpeptiden aus rGAD,
- Abb. 4A zeigt das Ergebnis eines Peptid-Screeningassays der T-Zelllinie 24/31 mit rekombinanter humaner GAD bzw. Peptidpools,
- Abb. 4B zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays mit der T-Zelllinie 24/31 mit Einzelpeptiden aus GAD,
- Abb. 5 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung von TCR- α -Ketten aus Klonen der T-Zelllinien 40/2 und 24/31,
- Abb. 6 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung von TCR- β -Ketten aus Klonen der T-Zelllinien 40/2 und 24/31.
- SEQ ID No. 1-7 zeigen die erfindungsgemäßen autoreaktiven Aminosäuresequenzen (I)-(VII),
- SEQ ID No. 8-11 zeigen die autoreaktiven Aminosäuresequenzen gemäß Abb. 1,
- SEQ ID No. 12-28 zeigen die autoreaktiven Aminosäuresequenzen gemäß Abb. 2, und

SEQ ID No. 29-30 zeigen weitere autoreaktive Aminosäuresequenzen gemäß EP 95 100 764.0.

BEISPIEL 1

5 Etablierung von GAD-spezifischen T-Zelllinien

1. Primärstimulation

Durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation werden aus EDTA-Blut von Typ I-Diabetikern die peripheren Blut-Lymphozyten
10 (PBLs) gewonnen. Die Zellen werden 2 mal in RPMI-Medium gewaschen und dann in einem Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, 5 % Humanserum, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, aufgenommen. Pro Napf einer 96 Napf Rundboden-Platte werden 100 µl Zellsuspension, entsprechend
15 100000 Zellen, eingesät. Danach erfolgt die Zugabe von rekombinanter humaner GAD 65 kd (rGAD), die im Baculovirus-System exprimiert wurde, in einer Endkonzentration von 3 bis 5 µg/ml. Die Zellen werden 3-4 Tage im Blutschrank bei 37°C/7 % CO₂ inkubiert. Nach diesem Zeitraum erfolgt Zugabe von 100 µl IL-2
20 (5 U/ml). Nach weiteren 3-4 Tagen werden von allen Kulturan-sätzen 100 µl abgesaugt und wiederum 100 µl IL-2 (5 U/ml) zugegeben. Dies wird alle 3-4 Tage wiederholt.

2. Restimulation

25 Am Tag 14 nach dem Beginn der Primärstimulation erfolgt die erste Restimulation. Hierfür wird im Vergleich zur Primärstimulation die doppelte Anzahl von autologen PBLs mittels Ficoll isoliert und in Kulturmedium auf eine Zellkonzentration von 2×10^6 /ml eingestellt. Eine Hälfte dieser Stimulatorzellen
30 wird mit dem Antigen rGAD (Endkonzentration 3 bis 5 µg/ml) für 2 Stunden/37°C/7 % CO₂ inkubiert (Antigen-Pulse). Die andere Hälfte wird unter gleichen Bedingungen ohne Antigen, nur mit Kulturmedium inkubiert. Anschließend werden alle Stimulatorzellen mit 4000 rad bestrahlt. Die Stimulatorzellen werden
35 dann in 96 Napf Rundboden-Platten verteilt (je 100000 Zellen/Napf) und zwar so, daß immer ein Napf mit Antigen enthaltenden

Stimulatorzellen benachbart zu einem Loch mit Stimulatorzellen ohne Antigen zu liegen kommt.

Anschließend erfolgt die Präparation der T-Zellen aus den
5 Primärstimulationsansätzen. Hierfür werden die Überstände aus den Primärstimulationsansätzen abgesaugt und die Zellen in den Platten zweimal mit je 100 µl Waschmedium (Dulbeccos Modified Eagle Medium = DMEM) gewaschen. Dazwischen werden die Zellen in den Platten bei 400 g zentrifugiert. Anschließend werden
10 die Zellen in je 100 µl Kulturmedium aufgenommen und je 50 µl auf zwei benachbarte Näpfe der Restimulations-Platte verteilt. Auf diese Weise werden die T-Zellen in einem Napf mit Antigen inkubiert und im benachbarten Napf ohne Antigen kann die Antigen-Spezifität der Restimulation kontrolliert werden.

15

Ab dem 2. oder 3. Tag nach dem Beginn der Restimulation kann die Proliferation mikroskopisch beurteilt werden. Dabei werden nur solche Mikrokultur-Pärchen als relevant angesehen, bei denen nur im Napf mit Antigen-Anwesenheit Proliferation er-
20 folgt. Ab Tag 4 wird wiederum zu jedem Kultur-Napf 100 µl IL-2 (5 U/ml) zugegeben. Bis zum Tag 14 wird alle 3-4 Tage ca. 50 % des Kulturmediums gegen IL-2 (5 U/ml) ausgetauscht.

Bei gutem Wachstum werden die Kulturen auf mehrere 96er Näpfe
25 aufgeteilt. Bei späteren Restimulationen kann auch in größere Näpfe aufgeteilt werden. Alle 2 Wochen erfolgt eine erneute Restimulation nach der oben beschriebenen Methode. Ab der 3. Restimulation wird die Spezifität der Mikrokulturen in einem Proliferationstest ermittelt.

30

3. Proliferationstest mit rekombinanter humaner GAD 65 kd
Alle Tests werden mindestens in Doppel-Ansätzen durchgeführt.

a) Stimulator-Zellen:

35 Als Stimulatorzellen (APC) werden autologe PBLs oder in den HLA-Klasse II Antigenen identische PBLs eines normalen Spenders verwendet. Die PBLs werden in einer Zahl von

100000 pro Loch einer 96 Napf-Platte verteilt und mit rGAD in einer Endkonzentration von 3 bis 5 µg/ml versetzt. In Kontrollansätzen wird statt Antigen ein gleiches Volumen an Medium vorgegeben. Nach Inkubation von
5 2 h bei 37°C und 7 % CO₂ werden die Stimulatorzellen mit 4000 rad bestrahlt.

b) T-Zellen

Die verwendeten T-Zellen stammen immer aus der Abschlußphase einer Restimulationsperiode. Sie werden 3 mal mit
10 DMEM von Antigen und IL-2-freigewaschen und mit 6000 bis 10000 Zellen/96er Napf verteilt.

Nach 3-4 Tagen bei 37°C/7 % CO₂ erfolgt die Zugabe von
15 1 µCi ³H-Thymidin und weitere Inkubation für 16-20 Stunden. Danach erfolgt das Übertragen der Zellen auf einen Glasfaserfilter mittels eines Zell-Ernte Gerätes und die Bestimmung der eingebauten Radioaktivität im β-Zählgerät. Die Proliferationsaktivität der T-Zelllinien wird mittels
20 eines Stimulationsindex (SI) ausgedrückt. Dies ist der Quotient aus den cpm in Anwesenheit von rGAD dividiert durch die cpm in den Kontrollansätzen ohne Antigen. Abb. 3A (Säule rGAD) zeigt ein typisches Ergebnis eines Proliferationstests mit rGAD und den Linien R.B. und M.C.

25

4. Proliferationstest mit Peptiden, die aus der H-GAD 65 kd Sequenz abgeleitet sind

T-Zelllinien, die über mindestens 4 Restimulationsrunden expandiert wurden und mit rGAD im Proliferationstest reagierten,
30 wurden zusätzlich mit überlappenden Peptiden der rGAD getestet. Diese Experimente haben zum Ziel, die von den T-Zellen erkannten Epitope der rGAD zu definieren. Dazu werden zunächst sich überlappende 20 mer Peptide der rGAD synthetisiert (Überlappungsbereich 10 Aminosäuren, insgesamt 59 verschiedene
35 Peptide).

Jeweils 4-5 dieser Peptide werden zu einem Pool vereinigt und in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ zu den Stimulatorzellen gegeben (Präparation der Stimulatorzellen wie unter Abschnitt 3a beschrieben).

5

Danach erfolgt die Zugabe von 6000-20.000 T-Zellen pro Mikrokultur-Napf. Das weitere Verfahren ist analog dem unter Abschnitt 3b beschriebenen.

10 Abbildung 3A zeigt die Ergebnisse dieses Peptid-Screeningassays. Die T-Zelllinie R.B. reagiert mit dem Peptidpool, der den rGAD-Sequenzabschnitt 46-115 enthält, während die T-Zelllinie M.C. Peptide aus dem Sequenzabschnitt 216 - 285 erkennt. In Abbildung 3B bzw. 3C sind die Reaktivitäten der T-Zelllinie R.B.
15 bzw. M.C. mit den Einzelpeptiden des jeweiligen Peptidpools dargestellt. Die Linie R.B. reagiert ausschließlich mit dem Peptid p86-105, während die Linie M.C. für das Peptid p246 - 265 spezifisch ist. Bei diesen Proliferationstests wurden die Peptide in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

20

Abb. 4A zeigt das Ergebnis eines weiteren Peptid-Screeningtests mit der T-Zelllinie 24/31. Diese T-Zelllinie reagiert spezifisch mit den Peptidpools 1, 4 und 11. In Abb. 4B sind die Reaktivitäten dieser T-Zelllinie mit den Einzelpeptiden aus
25 diesen Pools dargestellt. Daraus läßt sich ableiten, daß die T-Zelllinie 24/31 mit den Peptiden p166-185 und p176-195 reagiert.

BEISPIEL 2

30 Bestimmung des Subtyps von MHC-Molekülen, die den T-Zelllinien R.B. und M.C. autoreaktive Peptide präsentieren

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog dem Beispiel 1.4. Als Antigen-präsentierende Zellen wurden allerdings keine autologen PBLs verwendet, sondern Epstein Barr Virus transformierte
35 B-Zellen mit definierten MHC-Allelen (sogenannte homozygote Typisierungszelllinien). Diese wurden so ausgewählt, daß nur

eine teilweise Übereinstimmung mit den MHC-Klasse II Molekülen des Spenders der T-Zelllinien gegeben war, z.B. Identität in den DR-Allelen, Nichtidentität bezüglich der DQ-Allele. In Abweichung vom beschriebenen Beispiel 1.4 wurden die Peptide
5 nach dem Antigenpulse ausgewaschen, um eine Autopräsentation durch die T-Zellen zu vermeiden.

Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 1 dargestellt. Die T-Zellproliferation ist als Stimulationsindex (SI) ausge-
10 drückt.

Das Ergebnis dieser Analyse ist bei der T-Zelllinie R.B. eindeutig. Nur wenn die Antigen-präsentierenden Zellen das Peptid p86-106 in Assoziation mit DRB1*0101 präsentieren, erfolgt
15 eine Stimulation der T-Zellen. Andere DR-Allele können das Peptid nicht präsentieren, eine Beteiligung des DQ-Alleles DQB1*0501 konnte ausgeschlossen werden (siehe Ergebnis mit den antigenpräsentierenden Zellen MZ070782). Somit ist DRB1*0101 das Restriktionselement für die T-Zelllinie R.B. Für die T-
20 Zelllinie M.C. konnte das Restriktionselement durch diese Art der Analyse nicht im Detail aufgeklärt werden, da das DR-Allel DRB1*1501 und das DQ-Allel DQB1*0602 in der kaukasischen Bevölkerung eng gekoppelt vorliegen. Die Analyse ergab eine Präsentation des Peptids entweder über die DR-Allele DRB1*1501
25 bzw. 1601 oder über das DQB1*0602 Allel.

Tabelle 1

APC	DRB1* :DQB1*	kein Antigen (CPM)	T-Zelllinienproliferation		
			rGAD (SI)	Peptid 86-105 (SI)	246-265 (SI)
10 PBMC	R.B. T-Zelllinie	898	56	28	
JESTHOM	0101/0401 :0501/0302	840	-	20	
HOM2	0101 :0501	215	-	118	
YAR	0402 :0302	2859	-	-	
MZ070782	0102 :0501	3000	-	-	
15 PE117	0404 :0302	6238	-	-	
DEU	0401 :0301	2182	-	-	
PBMC	M.C. T-Zelllinie	864	32	28	
20 HHKB	1501/1302 :0602/0604	749	-	-	
KAS011	1301 :0603	961	-	-	
OMW	1601 :0502	792	-	-	
E4181324	1301 :0603	896	-	-	
WT47	1502 :0601	526	-	34	
25 WT8	1302 :0604	1079	-	-	
HO31	1501 :0602	1300	11	41	
EA	1302 :0604	3298	-	-	
	1501 :0602		13	12	

BEISPIEL 3

Identifizierung des autoreaktiven Peptids p556-p575

Analog dem in Beispiel 1.4 beschriebenen Verfahren wurde ein
5 Screening nach weiteren autoreaktiven Peptiden aus der humanen
GAD 65 kd durchgeführt. Dabei wurde gefunden, daß die T-
Zelllinie 40/2 mit einem einzigen Peptidpool reagiert. Bei
einer Untersuchung der Einzelpeptide dieses Peptidpools wurde
festgestellt, daß die T-Zelllinie 40/2 ausschließlich mit dem
10 Peptid p556-575 reagiert.

Zur Bestimmung des Isotyps von MHC-Molekülen, die das autore-
aktive Peptid p556-575 präsentieren, wurden autologe PBL mit
monoklonalen Antikörpern, welche HLA-DR, HLA-DQ und HLA-Klasse
15 I-Moleküle erkennen, vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe
von Peptid p556-575. Nach einer Zwischeninkubation von 3 h
wurden die T-Zellen zugegeben und ein Proliferationstest
durchgeführt. Dabei wurde gefunden, daß eine signifikante
Inhibition der Proliferation nur in Anwesenheit desjenigen
20 monoklonalen Antikörpers, der HLA-DR erkennt, erfolgt. Da der
Patient, aus dem die T-Zelllinie 40/2 entwickelt wurde, homozy-
got das Allel DR B1*0401 exprimiert, ist dieses somit als
Restriktionselement identifiziert.

25 BEISPIEL 4

Identifizierung von T-Zellrezeptoren (TCR)

Zur Identifizierung und Sequenzierung von GAD-spezifischen TCR
wurde aus T-Zellen Gesamt-RNA isoliert. Hierzu wurden die
30 Zellen in Suspension mit PBS gewaschen und das Zellpellet mit
0,2 ml RNazol-B pro 1×10^6 Zellen resuspendiert. Nach mehr-
fachem mechanischen Resuspendieren der Lysate und gegebenen-
falls Zugabe von Hefe tRNA als Trägermatrix erfolgte die RNA-
Extraktion durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 2 ml Homoge-
35 nisat, nachfolgendem Mischen für 15 sek. und 5-minütiger Lage-
rung auf Eis.

Nach einem Zentrifugationsschritt von 12.000 g für 15 min. wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die erste Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe eines identischen Volumens Isopropanol und anschließender Lagerung für mindestens 15 min. bei 4 °C. Nach Zentrifugation für 15 min. bei 12.000 g und 4 °C wurde die RNA als Pellet am Grund des Gefäßes erhalten.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das RNA-Pellet durch kurzes Mischen in 75 % Ethanol von Salzen gereinigt. Nach Zentrifugation (7.500 g, 4 °C, 8 min.) wurde das Pellet in 100 µl mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser gelöst und mit 250 µl Ethanol und 10 µl 2M NaCl für mindestens 1 h bei -20 °C erneut präzipitiert. Die Zentrifugations- und Waschschriffe nach der zweite Präzipitation erfolgten wie bei der ersten Fällung beschrieben. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde die RNA in H₂O-DEPC resuspendiert.

Aus der RNA wurde durch reverse Transkription cDNA synthetisiert. Hierzu wurden ca. 3 µg Gesamt-RNA mit 30 ng p-CαST (ein für die TCR-α-Kette spezifischer Primer mit der Sequenz 5'-CAC TGA AGA TCC ATC ATC TG-3') und 30 ng p-CβST (ein für die β-Kette spezifischer Primer mit der Sequenz 5'-TAG AGG ATG GTG GCA GAC AG-3') in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für 10 min. bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden 38 µl RAV-2-RT-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 140 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM Dithiothreitol, jeweils 0,1 mM dNTP), 1 µl (0,75 U) rRNasin und 1 µl (18 U) reverse Transkriptase zupipettiert. Die reverse Transkription erfolgte für 90 min. bei 42 °C, gefolgt von einem Denaturierungsschritt bei 68 °C für 5 min. Die Lagerung bis zum Verbrauch erfolgte bei -80 °C.

Anschließend wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Mit Hilfe von 5'-familienspezifischen Primern für die variablen Domänen der α- und β-Ketten wurde durch das Auftreten eines Amplifikats angezeigt, ob die entsprechende V-Familie exprimiert wird oder nicht. Die 3'-Primer lagen in der

- 34 -

konstanten Domäne und waren bei allen α - bzw. β -Ansätzen gleich. Ein Kontrollamplifikat, welches in der konstanten Domäne liegt und nicht mit dem spezifischen Amplifikationsprodukt überlappt, zeigt an, ob die PCR-Reaktion in diesem
5 Ansatz funktioniert hat und konnte zur semiquantitativen Bestimmung der V-familienspezifischen Expression dienen.

Die Primer wurden auch biotinyliert eingesetzt, um eine nachfolgende Aufreinigung der PCR-Produkte durch Kopplung an eine
10 magnetische partikuläre Festphase (Streptavidin-beschichtete Beads) zu ermöglichen.

Die PCR wurde unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase mit folgendem Reaktionsschema durchgeführt:

15

94 °C 4 min. Prädenaturierung
94 °C 30 sek. DNA-Denaturierung
56 °C 30 sek. Annealinig
72 °C 1 min. Extension
20 72 °C 5 min. Auffüllen aller Einzelstränge in der Reaktionslösung (nur am Ende)

Die Anzahl von Reaktionszyklen bei der PCR war in der Regel 35.

25

Die auf diese Weise erhaltenen PCR-Fragmente wurden sequenziert.

Die 4 unabhängig isolierten GAD-spezifischen T-Zellklone des
30 Patienten 24: 24/31#1/1, 24/31#1/4, 24/31#9, 24/31#PF7 exprimieren alle den gleichen TCR. Dieser setzt sich zusammen aus: V α 8 (AV8S1A1) und V β 5 (BV5S1A1T). Auch die verwendeten J-Gen-segmente und die CDR3-Regionen sind identisch.

35 Der T-Zellklon 40/2#20 des Patienten 40 exprimiert 2 α -Ketten, nämlich V α 2 (AV2S1A2) und V α 21 (ADV21S1A1) und eine V β -Kette, V β 2 (BV2S1A4T).

- 35 -

In Abb. 5 und 6 sind die Sequenzdaten der CDR3-Regionen aus den TCR- α - bzw. TCR3- β -Ketten gezeigt.

Die vollständigen Sequenzen der TCR können mit Hilfe bekannter Sequenzen aus der GENBank/EMBL-Datenbank ohne weiteres bestimmt werden. Die jeweiligen Zugriffsnummern (Accession numbers) sind wie folgt:

V α 8 (AV8S1A1)	X04954/M13734
10 V α 2 (AV2S1A2)	M17652
V α 21 (ADV21S1A1)	M15565
V β 5 (BV5S1A1T)	X04954
V β 2 (BV2S1A4T)	M11954

15

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 112-132
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: DE
- (F) POSTLEITZAHL: 68305

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Autoreaktive Peptide aus der humanen Glutamin-Decarboxylase (GAD)

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 30

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 19525784.7
- (B) ANMELDETAG: 14-JUL-1995

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Asp	Val	Asn	Tyr	Ala	Phe	Leu	His	Ala	Thr	Asp	Leu	Leu	Pro	Ala	Cys
1				5					10					15	
Asp	Gly	Glu	Arg												
			20												

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Ser	Asn	Met	Tyr	Ala	Met	Met	Ile	Ala	Arg	Phe	Lys	Met	Phe	Pro	Glu
1				5					10					15	

Val Lys Glu Lys
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Asn Trp Glu Leu Ala Asp Gln Pro Gln Asn Leu Glu Glu Ile Leu Met
 1 5 10 15

His Cys Gln Thr
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Thr Leu Lys Tyr Ala Ile Lys Thr Gly His Pro Arg Tyr Phe Asn Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Thr Gly
20

(. ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Pro Arg Tyr Phe Asn Gln Leu Ser Thr Gly Leu Asp Met Val Gly Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Asp Trp
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Leu Glu Tyr Val Thr Leu
1 5 10 15
Lys Lys Met Arg
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Phe Phe Arg Met Val Ile Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile
 1 5 10 15
 Asp Phe Leu Ile
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Ile Leu Ile Lys Cys Asp Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Ser
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Leu Gly Ile Gly Thr Asp Ser Val Ile Leu Ile Lys Cys Asp
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Leu Ala Phe Leu Gln Asp Val Met Asn Ile Leu Leu Gln Tyr
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Tyr Asp Leu Ser Tyr Asp Thr Gly Asp Lys Ala Leu Gln Cys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Val Ser Tyr Gln Pro Leu Gly Asp Lys Val Asn Phe Phe Arg
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Leu Ala Ala Asp Trp Leu Thr Ser Thr Ala Asn Thr Asn Met
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Leu Leu Tyr Gly Asp Ala Glu Lys Pro Ala Glu Ser Gly Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Val Asn Tyr Ala Phe Leu His Ala Thr Asp Leu Leu Pro Ala
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Leu Leu Gln Tyr Val Val Lys Ser Phe Asp Arg Ser Thr Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Phe Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Leu Glu Tyr
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Leu Glu Tyr Val Thr Leu Lys Lys Met Arg Glu Ile Ile Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Asn Met Tyr Ala Met Met Ile Ala Arg Phe Lys Met Phe Pro
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Lys Ile Trp Met His Val Asp Ala Ala Trp Gly Gly Gly Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Trp Gly Gly Gly Leu Leu Met Ser Arg Lys His Lys Trp Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Glu Gly Tyr Glu Met Val Phe Asp Gly Lys Pro Gln His Thr
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Arg Tyr Phe Asn Gln Leu Ser Thr Gly Leu Asp Met Val Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Trp Leu Thr Ser Thr Ala Asn Thr Asn Met Phe Thr Tyr Glu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

Thr Ala Asn Thr Asn Met Phe Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Leu Val Ser Ala Thr Ala Gly Thr Thr Val Tyr Gly Ala Phe
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

Tyr Ile Pro Pro Ser Leu Arg Thr Leu Glu Asp Asn Glu Glu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFCRM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Val Ile Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile Asp Phe
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 25 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

Gly Met Ala Ala Leu Pro Arg Leu Ile Ala Phe Thr Ser Glu His Ser
1 5 10 15

His Phe Ser Leu Lys Lys Gly Ala Ala
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Ser Asp Leu Glu Arg Arg Ile Leu Glu
1 5 10 15

Ala Lys Gln Lys
20

Patentansprüche

1. Peptid oder Peptid-Derivat, umfassend:
- 5 (a) die Aminosäuresequenz (I)
D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-G-E-R,
- (b) die Aminosäuresequenz (II)
S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,
- 10 (c) die Aminosäuresequenz (III)
N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,
- (d) die Aminosäuresequenz (IV)
15 T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,
- (e) die Aminosäuresequenz (V)
P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,
- 20 (f) die Aminosäuresequenz (VI)
T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,
- (g) die Aminosäuresequenz (VII)
F-F-R-M-V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F-L-I,
- 25 (h) Teilbereiche der in (a), (b), (c), (d), (e), (f)
oder/und (g) dargestellten Aminosäuresequenzen mit
einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und
- 30 (i) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äqui-
valente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an
MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c), (d), (e),
(f), (g) oder/und (h) dargestellten Aminosäurese-
quenzen zeigen.
- 35

- 46 -

2. Peptid oder Peptid-Derivat nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Länge von mindestens 8 Aminosäuren aufweist.
- 5 3. Peptid oder Peptid-Derivat nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Länge von mindestens 10 Aminosäuren aufweist.
4. Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis
10 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Länge von bis zu 25 Aminosäuren aufweist.
5. Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis
15 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Markierungsgruppe trägt.
6. Peptidmimetikum,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß es eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/
und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie ein Peptid
oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5
aufweist.
- 25 7. Komplex, der mindestens ein Peptid oder Peptid-Derivat
nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder ein Peptidmimetikum
nach Anspruch 6 umfaßt, das an ein MHC-Molekül oder ein
peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls gebunden ist.
- 30 8. Komplex nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein MHC-Klasse II-Molekül oder ein peptidbindendes
Derivat davon umfaßt.
- 35

9. Komplex nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß das MHC-Klasse II-Molekül den Typ DR1, DR2, DR4 oder DQ6 aufweist.
- 5
10. Komplex nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß das MHC-Klasse II-Molekül den Subtyp DR B1*0101, DR B1*1501, DR B1*1502, DR B1*1601, DR B5*0101, DR B1*0401,
10 oder DQ B1*0602 aufweist.
11. Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein rekombinantes MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon umfaßt.
- 15
12. Komplex nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein lösliches peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls umfaßt.
- 20
13. Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß er eine Markierungsgruppe trägt.
- 25
14. Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens 2 MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-derivate enthält, die über kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen assoziiert sind.
- 30
15. Komplex nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß er durch chemische Kopplungsreagenzien quervernetzte Peptid-MHC-Molekül-Komplexe enthält.
- 35

16. Komplex nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß er durch eine oligomerisierte Peptidkomponente mit
mehreren MHC-bindenden Bereichen vernetzte MHC-Moleküle
oder MHC-Molekülderivate enthält.
17. Komplex nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß er durch Antikörper vernetzte Peptid-MHC-Molekül-
Komplexe enthält.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der
Ansprüche 1 bis 5, ein Peptidmimetikum nach Anspruch 6
oder/und einen Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17
als aktive Komponente gegebenenfalls in Kombination mit
pharmazeutisch üblichen Zusatzstoffen enthält.
19. Zusammensetzung nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie weiterhin eine akzessorische stimulierende Kom-
ponente umfaßt.
20. Zusammensetzung nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß die akzessorische stimulierende Komponente ausgewählt
ist aus Cytokinen oder/und der Oberflächenantigen B7.
21. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach
einem der Ansprüche 18 bis 20 zur Herstellung eines Mit-
tels für die Diagnose von Erkrankungen oder einer Prä-
disposition für Erkrankungen, die das Immunsystem beein-
flussen, oder von Tumorerkrankungen oder einer Prädispo-
sition für Tumorerkrankungen.

22. Verwendung nach Anspruch 21 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen.
- 5 23. Verwendung nach Anspruch 21 oder 22 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Diabetes oder einer Prädisposition für Diabetes.
- 10 24. Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine T-Zellen enthaltende Probe mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder/und einem
15 Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17 in Kontakt bringt und die Reaktion von T-Zellen in der Probe mit dem Peptid oder Komplex bestimmt.
- 20 25. Verfahren nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Reaktion der T-Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Peptid oder Komplex durch FACS-Analyse bestimmt.
- 25 26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß man vor und/oder nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen durchführt.
- 30 27. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen.
- 35

28. Verwendung nach Anspruch 27 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Autoimmunerkrankungen.
- 5 29. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Diabetes.
30. Verwendung eines Peptids oder Peptid-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 5, eines Peptidmimetikums nach Anspruch 6 oder eines Komplexes nach einem der Ansprüche 7
10 bis 17 zur Herstellung eines Antigens, insbesondere eines Immunogens oder Tolerogens.
31. Verfahren zur Isolierung einer spezifischen T-Zell-Sub-
15 population,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine T-Zellen enthaltende Probe mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder einem Komplex
20 nach einem der Ansprüche 7 bis 17 in Kontakt bringt, die mit dem Peptid oder Komplex reagierenden T-Zellen identifiziert und gegebenenfalls von anderen T-Zellen abtrennt.
32. Verfahren nach Anspruch 31,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß man vor oder/und nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen durchführt.
- 30 33. Verwendung von nach dem Verfahren gemäß Anspruch 31 isolierten T-Zellen oder Teilstrukturen davon zur Herstellung eines Antigens.

34. Verwendung nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß die T-Zellen oder Teilstrukturen davon in den Patienten,
aus dem sie ursprünglich stammen, reinjiziert werden.
35. Verwendung nach Anspruch 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß inaktivierte T-Zellen reinjiziert werden.
36. Verwendung nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß teilungsfähige T-Zellen reinjiziert werden.
37. Antikörper gegen ein Peptid oder Peptid-Derivat nach
einem der Ansprüche 1 bis 5, ein Peptidmimetikum nach
Anspruch 6 oder einen Komplex nach einem der Ansprüche 7
bis 17, erhältlich durch Immunisierung mit dem Peptid,
Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder Komplex und Gewinnung
eines durch die Immunisierung erzeugten Antikörpers.
38. Anti-idiotypischer Antikörper gegen einen Antikörper nach
Anspruch 37, erhältlich durch Immunisierung mit dem Antikörper
gegen das Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum
oder den Komplex und Gewinnung eines durch die Immunisierung
erzeugten anti-idiotypischen Antikörpers.
39. T-Zelle, die mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach
einem der Ansprüche 1 bis 3, einem Peptidmimetikum nach
Anspruch 6 oder einem Komplex nach einem der Ansprüche 7
bis 17 reagiert.
40. Verwendung von Peptiden aus Glutamin-Decarboxylase (GAD),
davon abgeleiteten Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika
zur Herstellung eines Arzneimittels, das bei Verabreichung
an Diabetes-Patienten zur Ausbildung einer Immuntoleranz führt.

41. Verwendung nach Anspruch 40,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Peptide, Peptid-Derivate oder Peptidmimetika
in einer Dosis von 3 bis 30 mg pro kg Körpergewicht
5 verabreicht.
42. Verwendung nach Anspruch 40 oder 41,
dadurch gekennzeichnet,
daß nach Verabreichung der Peptide, Peptid-Derivate oder
10 Peptidmimetika mindestens noch eine zweite Vakzinierung
durchgeführt wird.
43. Verwendung nach einem der Ansprüche 40 bis 42,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß man bei der zweiten und gegebenenfalls folgenden
Vakzinierungen die bereits zur Erstvakzinierung verwendeten
Peptide, Peptid-Derivate oder Peptidmimetika komplette
GAD oder/und einen die Sequenz der Peptide enthaltenden
Teil davon einsetzt.
- 20 44. Verwendung nach Anspruch 43,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Vakzinierungen jeweils in Intervallen von 7 bis
14 Tagen erfolgen.
- 25 45. Verwendung nach einem der Ansprüche 40 bis 44,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Mischung von unterschiedlichen Peptiden,
Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika verabreicht.
- 30 46. T-Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen T-Zellrezeptor enthält, der an ein Peptid
oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, ein
35 Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder einen Komplex nach
einem der Ansprüche 7 bis 17 bindet.

47. T-Zelle nach Anspruch 46,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen T-Zellrezeptor aufweist, der eine TCR α -
Kette mit einer in Abb. 5 dargestellten oder einer dazu
mindestens 70 % homologen CDR3-Region oder/und eine TCR β -
Kette mit einer der in Abb. 6 dargestellten oder einer
dazu mindestens 70 % homologen CDR3-Region umfaßt.
48. Polypeptid mit T-Zellrezeptor-Aktivität,
dadurch gekennzeichnet,
daß es an ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der
Ansprüche 1 bis 5, ein Peptidmimetikum nach Anspruch 6
oder einen Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17
bindet.
49. Polypeptid nach Anspruch 48,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine TCR- α -Kette mit einer in Abb. 5 dargestellten
CDR3-Region oder einer dazu mindestens 70 % homologen
Aminosäuresequenz umfaßt.
50. Polypeptid nach Anspruch 48 oder 49,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine TCR- β -Kette mit einer in Abb. 6 dargestellten
CDR3-Region oder einer dazu mindestens 70 % homologen
Aminosäuresequenz umfaßt.
51. Nucleinsäure,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche
48 bis 50 kodiert.

Abb. 1

I-L-I-K-C-D-E-R-G-K-M-I-P-S
L-G-I-G-T-D-S-V-I-L-I-K-C-D
L-A-F-L-Q-D-V-M-N-I-L-L-Q-Y
Y-D-L-S-Y-D-T-G-D-K-A-L-Q-C

Abb. 2

V-S-Y-Q-P-L-G-D-K-V-N-F-F-R
L-A-A-D-W-L-T-S-T-A-N-T-N-M
L-L-Y-G-D-A-E-K-P-A-E-S-G-G
V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A
L-L-Q-Y-V-V-K-S-F-D-R-S-T-K
F-T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y
L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R-E-I-I-G
N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P
K-I-W-M-H-V-D-A-A-W-G-G-G-L
W-G-G-G-L-L-M-S-R-K-H-K-W-K
E-G-Y-E-M-V-F-D-G-K-P-Q-H-T
R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G
W-L-T-S-T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E
T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E-I-A-P-V
L-V-S-A-T-A-G-T-T-V-Y-G-A-F
Y-I-P-P-S-L-R-T-L-E-D-N-E-E
V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F

Abb.3

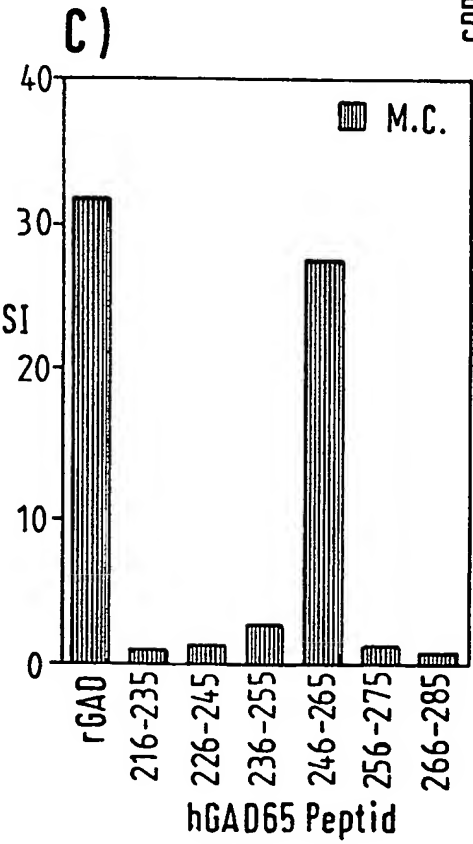
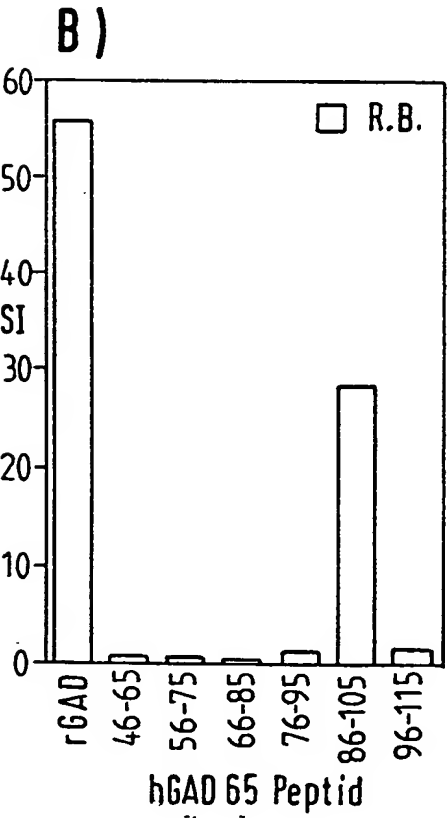
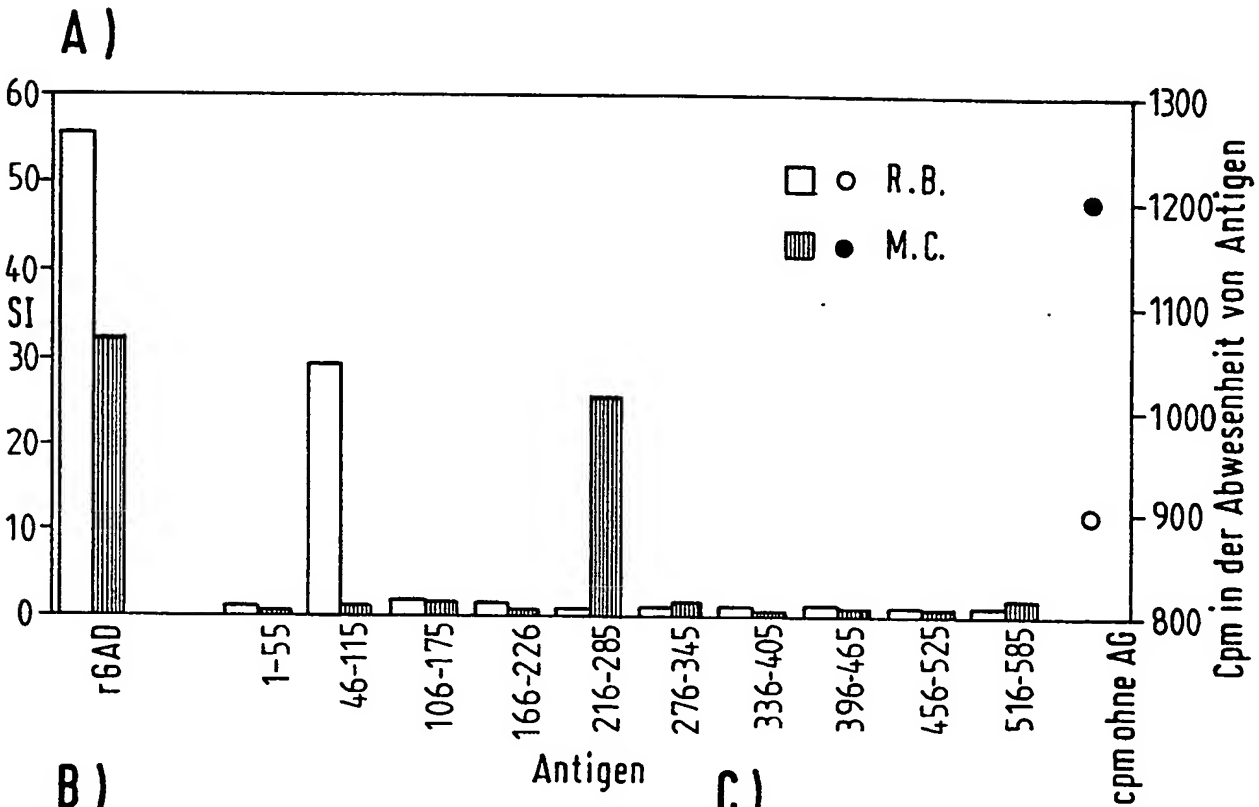


Abb. 4 B

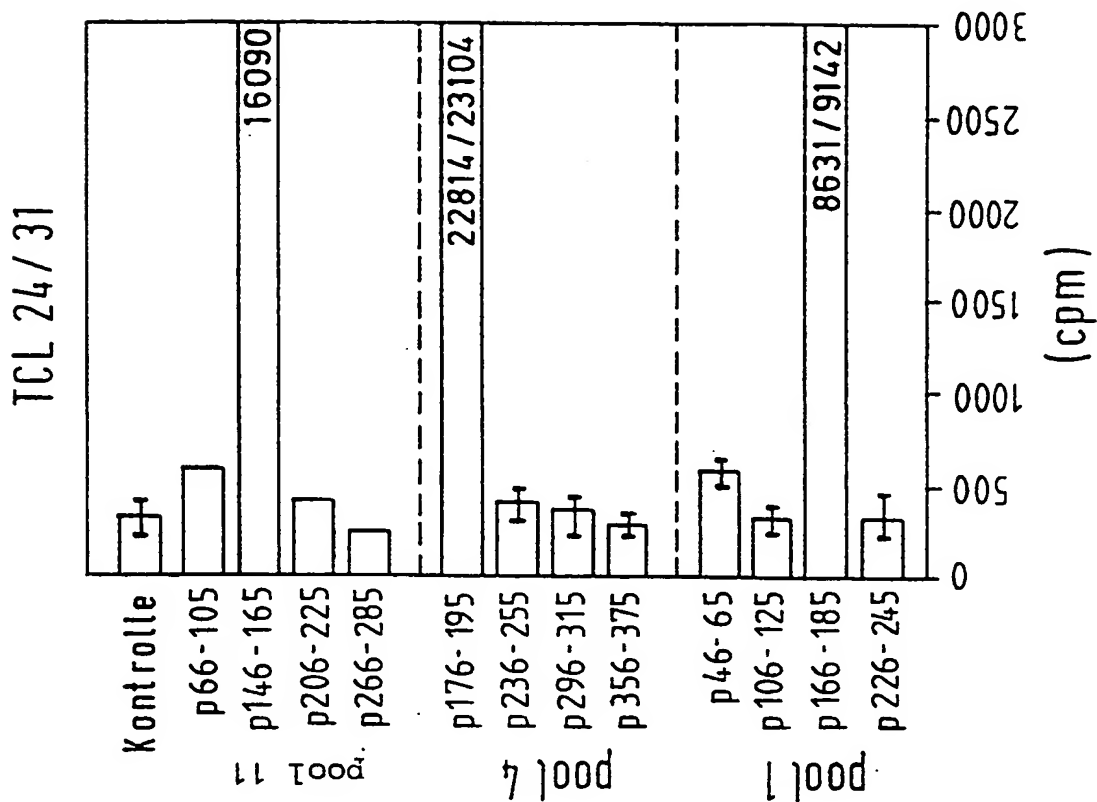
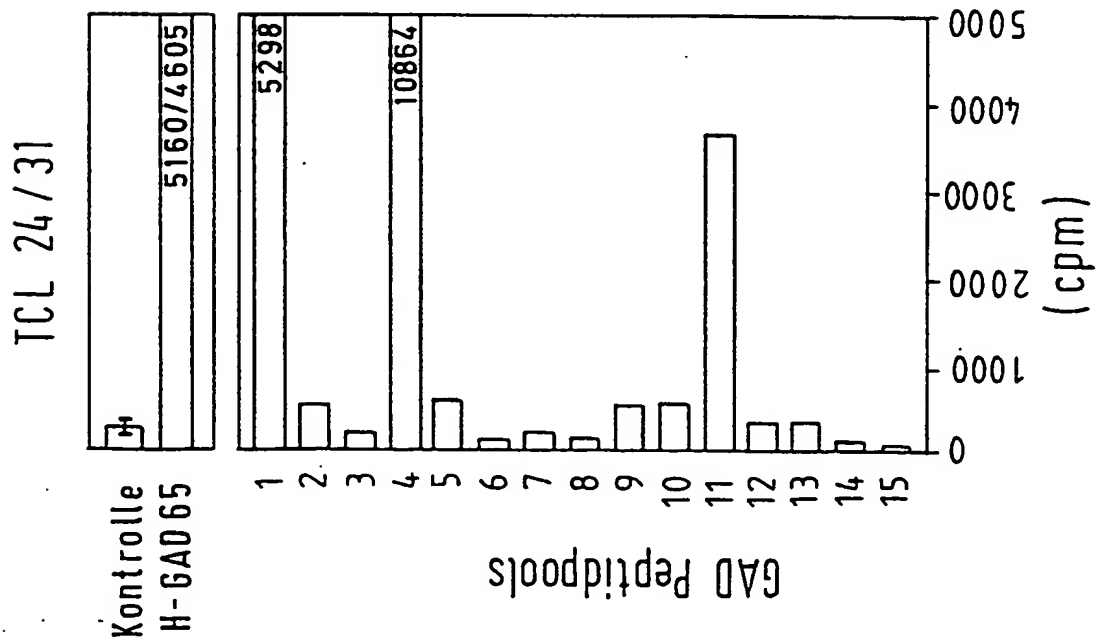


Abb. 4 A



5/6

ALPHA-KETTE TCRAV „N-Region“ TCRAJ

Patient 40Klon 40/2#20

C A V
TGTGCCGTG
TCRAV2S1A2

N I A
AACATTGCT

G G S Q G N L I F
GGCGGAAGCCAAGGAAATCTCATCTTT
TCRAJ42

Patient 24Klon 24/31#1/1

C A A
TGTGCAGCA
TCRAV8S1A1

R A M
AGGGCCATG

N R D D K I I F
AACAGAGATGACAAGATCATCTTT
TCRAJ30

Patient 24Klon 24/31#1/4

C A A
TGTGCAGCA
TCRAV8S1A1

R A M
AGGGCCATG

N R D D K I I F
AACAGAGATGACAAGATCATCTTT
TCRAJ30

Patient 24Klon 24/31#PF7

C A A
TGTGCAGCA
TCRAV8S1A1

R A M
AGGGCCATG

N R D D K I I F
AACAGAGATGACAAGATCATCTTT
TCRAJ30

Patient 24Klon 24/31#9

C A A
TGTGCAGCA
TCRAV8S1A1

R A M
AGGGCCATG

N R D D K I I F
AACAGAGATGACAAGATCATCTTT
TCRAJ30

Abb. 5

6/6

BETA-KETTE TCRBV „N-Region“ TCRBJ

Patient 40Klon 2/20

C S V

TGCAGTGCCT

TCRBV2S1A4T

S A G W

AGTGCGGGTTGG

S N Q P Q H F

AGCAATCAGCCCCAGCATTTT

TCRBJ1.5

Patient 24Klon 31/1/1

C X S

TGCXCCAGC

TCRBV5S1A1T

S L D A S G

AGCTTGGATGCGAGCGGG

S Y N E Q F F

AGCTACAATGAGCAGTTCTTC

TCRBJ

Patient 24Klon 31/1/4

C X S

TGCXCCAGC

TCRBV5S1A1T

S L D A S G

AGCTTGGATGCGAGCGGG

S Y N E Q F F

AGCTACAATGAGCAGTTCTTC

TCRBJ

Patient 24Klon 31/PF7

C X S

TGCXCCAGC

TCRBV5S1A1T

S L D A S G

AGCTTGGATGCGAGCGGG

S Y N E Q F F

AGCTACAATGAGCAGTTCTTC

TCRBJ

Patient 24Klon 31/9

C X S

TGCXCCAGC

TCRBV5S1A1T

S L D A S G

AGCTTGGATGCGAGCGGG

S Y N E Q F F

AGCTACAATGAGCAGTTCTTC

TCRBJ

Abb. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ional Application No
PCT/EP 96/03093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N9/88 C07K16/40 G01N33/564 C12N15/07

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0,A,95 07992 (UNIV CALIFORNIA) 23 March 1995 see the whole document ---	1-51
X	W0,A,94 12529 (UNIV CALIFORNIA) 9 June 1994 see the whole document ---	1-51
X	EP,A,0 519 469 (UNIV CALIFORNIA) 23 December 1992 cited in the application see the whole document --- -/-	1-38, 40-45, 48-51



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 November 1996

Date of mailing of the international search report

22. 11. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/03093

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J AUTOIMMUN, OCT 1994, 7 (5) P635-41, ENGLAND, XP000607295 CHEN SL ET AL: "Responses of NOD congenic mice to a *glutamic* *acid* *decarboxylase* -derived *peptide*." see the whole document ---	1-51
X,P	EP,A,0 665 289 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 2 August 1995 cited in the application see the whole document ---	1-51
E	WO,A,96 26218 (AMRAD OPERATIONS PTY LTD ;HARRISON LEONARD (AU); HONEYMAN MARGO (A) 29 August 1996 see the whole document -----	1-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/03093

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9507992	23-03-95	AU-A- 7920194 CA-A- 2170523 EP-A- 0719340	03-04-95 23-03-95 03-07-96
WO-A-9412529	09-06-94	EP-A- 0701569 JP-T- 8504406	20-03-96 14-05-96
EP-A-0519469	23-12-92	AU-B- 661684 AU-A- 1516392 CA-A- 2070004 JP-A- 7070182 US-A- 5475086	03-08-95 24-12-92 19-12-92 14-03-95 12-12-95
EP-A-0665289	02-08-95	DE-A- 4418091 CA-A- 2140591 CN-A- 1112933 JP-A- 7285996	27-07-95 21-07-95 06-12-95 31-10-95
WO-A-9626218	29-08-96	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N9/88 C07K16/40 G01N33/564 C12N15/07

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertester Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,95 07992 (UNIV CALIFORNIA) 23.März 1995 siehe das ganze Dokument ---	1-51
X	WO,A,94 12529 (UNIV CALIFORNIA) 9.Juni 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-51
X	EP,A,0 519 469 (UNIV CALIFORNIA) 23.Dezember 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-38, 40-45, 48-51
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. November 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22.11.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J AUTOIMMUN, OCT 1994, 7 (5) P635-41, ENGLAND, XP000607295 CHEN SL ET AL: "Responses of NOD congenic mice to a *glutamic* *acid* *decarboxylase* -derived *peptide*." siehe das ganze Dokument ---	1-51
X,P	EP,A,0 665 289 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 2.August 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-51
E	WO,A,96 26218 (AMRAD OPERATIONS PTY LTD ;HARRISON LEONARD (AU); HONEYMAN MARGO (A) 29.August 1996 siehe das ganze Dokument -----	1-51

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9507992	23-03-95	AU-A-	7920194	03-04-95
		CA-A-	2170523	23-03-95
		EP-A-	0719340	03-07-96

WO-A-9412529	09-06-94	EP-A-	0701569	20-03-96
		JP-T-	8504406	14-05-96

EP-A-0519469	23-12-92	AU-B-	661684	03-08-95
		AU-A-	1516392	24-12-92
		CA-A-	2070004	19-12-92
		JP-A-	7070182	14-03-95
		US-A-	5475086	12-12-95

EP-A-0665289	02-08-95	DE-A-	4418091	27-07-95
		CA-A-	2140591	21-07-95
		CN-A-	1112933	06-12-95
		JP-A-	7285996	31-10-95

WO-A-9626218	29-08-96	KEINE		